昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, February 2012, 55(2): 168 - 175 ISSN 0454-6296

Cry1Ac 杀虫蛋白对粘虫中肠几种酶活性的影响

解 娜[1,2], 江幸福[1], 罗礼智[1,*], 张 蕾[1]

(1. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193;
2. 华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070)

摘要: 为阐明 Bt 杀虫蛋白对次要靶标害虫粘虫 *Mythimna separata* (Walker) (鳞翅目: 夜蛾科)的生理学影响, 本研究分析比较了粘虫高龄幼虫在室内取食低剂量 Cry1Ac 杀虫蛋白 6, 12, 24 和 36 h 后, 其体内主要的解毒酶(酯酶和谷胱甘肽-S-转移酶)、保护酶(超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和过氧化物酶)和中肠蛋白酶(总蛋白酶、强碱性类胰蛋白酶、弱碱性类胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶)等活性的变化。结果表明, 取食 Cry1Ac 杀虫蛋白后, 粘虫幼虫体内相关酶活力呈现不同的变化趋势: (1)酯酶、谷胱甘肽-S-转移酶、过氧化物酶(POD)、类胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶活力较对照显著降低($P<0.05$); (2)超氧化物歧化酶(SOD) 活力较对照显著升高($P<0.05$); (3)过氧化氢酶(CAT) 活力于 6, 12 和 24 h 显著低于对照($P<0.05$), 36 h 时显著高于对照($P<0.05$)。结果提示 Cry1Ac 杀虫蛋白主要通过抑制粘虫幼虫中肠解毒酶和蛋白酶的活性, 扰乱 SOD, CAT 和 POD 3 种保护酶的动态平衡而干扰幼虫的正常生理代谢, 从而起到毒杀粘虫的作用。

关键词: 粘虫; Cry1Ac 杀虫蛋白; 解毒酶; 保护酶; 蛋白酶; 酶活性

中图分类号: Q965.9　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0454-6296(2012)02-0168-08

Effects of Cry1Ac toxin on activities of some enzymes in the larval midgut of the oriental armyworm, *Mythimna separata* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae)

XIE Na[1,2], JIANG Xing-Fu[1], LUO Li-Zhi[1,*], ZHANG Lei[1] (1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: In order to clarify the physiological effect of Cry1Ac toxin on the oriental armyworm, *Mythimna separata* (Walker), the activities of two detoxification enzymes (esterase and glutathione-S-transferase), three protective enzymes (superoxide dismutase, catalase and peroxidase) and midgut proteases (total protease, trypsin-like enzyme and chymotrypsin-like enzyme) in the 5th instar larvae of *M. separata* fed on Cry1Ac toxin were evaluated in the laboratory. The results showed that the activities of esterase, glutathione-S-transferase, peroxidase, trypsin-like enzyme and chymotrypsin-like enzyme in the larvae fed on an artificial diet containing Cry1Ac toxin were significantly lower than those of the control ($P<0.05$). However, the activity of superoxide dismutase in the larvae fed on the artificial diet containing Cry1Ac was significantly higher than that of the control ($P<0.05$). The activity of catalase of the treated larvae was obviously lower than that of the control at 6 h, 12 h and 24 h after treatment ($P<0.05$), but higher than that of the control at 36 h after treatment ($P<0.05$). These results suggest that the Cry1Ac toxin disturbs the regular metabolism of insects mainly through restraining the activities of detoxification enzymes and proteases and disturbing the balance among superoxide dismutase, catalase and peroxidase in the midgut of larvae, and thus kills the pests.

Key words: *Mythimna separata*; CrylAc toxin; detoxification enzymes; protective enzymes; proteases; enzyme activity

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08011-018B)

作者简介: 解娜, 女, 1986 年生, 河北保定人, 硕士研究生, 主要从事 Cry1Ac 杀虫蛋白对粘虫体内酶活性影响的研究, E-mail: nxie2966@126.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: lzluo@ippcaas.cn

收稿日期 Received: 2011-10-10; 接受日期 Accepted: 2012-02-03

转 Bt 基因抗虫作物自 1996 年被批准商业化种植以来，不仅其杀虫效果和经济效益十分显著，而且可与其他生物防治方法协同应用，提高防效，因此在害虫综合治理中的作用越来越重要（Blumberg *et al.*，1997；Liu *et al.*，2001；Stewart *et al.*，2001；Zhang *et al.*，2006；Wu *et al.*，2008）。目前，转 Bt 基因作物的杀虫机理和效果等主要针对亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* Guenée 和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* Hübner 等靶标害虫（Olsen and Daly，2000；He *et al.*，2003；Wu *et al.*，2003；徐艳聆等，2006；孙志新，2008），而对其他次要靶标害虫的杀虫机理、效果及风险评价研究较少。因此，研究 Bt 杀虫蛋白对次要靶标害虫的作用机理，对于进一步改善其抗虫效果，以及防止害虫抗性的产生都具有十分重要的意义。

粘虫 *Mythimna separata*（Walker）（鳞翅目：夜蛾科）是我国及亚洲其他国家粮食作物的重大害虫，曾给我国的粮食生产带来了巨大的经济损失（李光博等，1964；李光博，1979）。虽然粘虫并不是目前所开发的转 Bt 基因作物的主要靶标害虫，但由于粘虫是远距离季节性迁飞性害虫，同时也是危害水稻、玉米等作物的主要害虫，一旦转基因作物在我国开始商品化种植，粘虫的生物学习性或田间种群动态规律等必然会受到影响。目前，转基因作物对粘虫生长发育的影响已经引起了一些学者的重视（王冬妍等，2004；贠桂玲等，2004；王振营等，2005；常雪等，2007；蒋善军等，2010；Gao *et al.*，2011）。已有的研究报道主要集中于转 Bt 基因玉米对粘虫的毒杀效果影响，如一些报道认为转 Bt 基因玉米对初孵幼虫和暴食期的 4 和 5 龄幼虫均有显著的致死作用（王冬妍等，2004；王振营等，2005）。

另外，Bt 杀虫蛋白对粘虫生长发育的影响也已有报道，如蒋善军等（2010）较为系统地阐述了 Cry1Ac 杀虫蛋白对粘虫幼虫、蛹和成虫的生长发育、繁殖的影响作用。这些结果对于了解转 Bt 基因作物对粘虫的影响作用无疑是十分重要的。但是，转基因作物或 Bt 杀虫蛋白对粘虫的毒杀机理至今还没有报道。本研究拟通过室内评价低剂量 Bt 杀虫蛋白 Cry1Ac 对粘虫高龄幼虫中肠主要的解毒酶、保护酶和蛋白酶等活性影响，明确 Cry1Ac 对粘虫的生理学效应，不仅可以加深害虫对 Bt 杀虫蛋白的抗性机制的理解，而且对转 Bt 基因作物的抗性预警有一定的研究意义。

1　材料和方法

1.1　供试虫源

虫源来自河北康保（41.87°N，114.6°E）田间灯光诱捕的迁入成虫。

参照蒋善军等（2010），采用本实验室研制的专利人工饲料（申请号 201010197333.X），在室内进行单头饲养。主要饲养过程为：挑取初孵幼虫，在放有人工饲料的 12 孔细胞培养板（美国 Corning 公司）中单孔单头饲养至 6 龄，然后移入 6 孔细胞培养板中继续单孔单头饲养；幼虫化蛹 5 d 后，将蛹集中移入养虫箱（40 cm × 80 cm）中；羽化成虫每日饲喂并更换 5%（v/v）蜂蜜水，在羽化后第 5 天插入干谷子杆，供其产卵。室内饲养温度为 23 ± 1℃，相对湿度为 70% 左右，光周期为 14L∶10D。

1.2　杀虫蛋白处理

Bt 杀虫蛋白 Cry1Ac 购自美国一龙公司，在0.1 mmol/L 氢氧化钠溶液（pH 10.0）中溶解后，按比例与人工饲料混合均匀。供试 Cry1Ac 杀虫蛋白浓度为 2 μg/g（亚致死浓度）（蒋善军，2011）。

取个体大小一致、刚蜕皮的 5 龄粘虫幼虫（粘虫幼虫为害取食主要集中在 5 和 6 龄期，取食量分别占全幼虫期的 14.3% 和 75.1%，为暴食阶段，因此选择 5 龄初幼虫进行实验），饥饿 2 h 后饲喂 Cry1Ac 杀虫蛋白，于 6，12，24 和 36 h 后分别取样、解剖并截取中肠；以饲喂不含 Cry1Ac 的人工饲料为对照。

1.3　解毒酶活力测定

1.3.1　中肠酶液制备：将粘虫幼虫在 0 ~ 4℃ 下迅速解剖，截取中肠及其内含物，不同处理时间各取样 4 ~ 6 头幼虫，放入预冷的玻璃匀浆器中，加入 1 mL的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液（pH 7.0，含 0.1% Triton X-100）冰浴匀浆。匀浆液在 4℃ 下 10 000 × g 离心 20 min，取上清液作为酶源。每处理重复 3 次。

1.3.2　酯酶活力测定：参照 van Asperen（1962）方法进行。反应混合液含 10 μL 酶液、3.49 mL 0.04 mol/L 磷酸缓冲液（pH 7.0）和0.5 mL 4×10^{-4} mol/L α-乙酸萘酯液，在 37℃ 水浴中温育 30 min，加入 0.5 mL 显色剂（1% 固牢蓝 B 盐与 5% SDS 溶液按 2∶5混合），室温下放置 10 min，用酶标仪 Tecan Infinite 200（瑞士 Tecan 公司）在 600 nm 处测定吸光值。每样品重复测定 3 次，以 α-萘酚作标准

曲线。

1.3.3 谷胱甘肽-S-转移酶活力测定：参照 Booth 等（1961）方法进行。反应混合液含 0.1 mL 酶液、2.9 mL 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液（pH 8.0）、0.7 mL 0.03 mol/L 谷胱甘肽液和 50 μL 0.1 mol/L CDNB 液，以无酶的反应液为参比，使用酶标仪，在 340 nm 处读取 OD 值，30 s 读 1 次，连续监测 5 min。

1.4 保护酶活力测定

1.4.1 中肠酶液制备：粘虫幼虫在 0～4℃下迅速解剖，用预冷的 0.15 mol/L NaCl 溶液冲洗，截取中肠及其内含物，不同处理时间各取样 4～6 头幼虫；准确称取中肠重量，按照重量体积比（克/毫升）1∶9 的比例加入生理盐水，制备成 10% 组织匀浆；2 500 × g 离心 10 min 后，取上清为酶源。每处理重复 3 次。

1.4.2 超氧化物歧化酶（SOD）活力测定：具体操作步骤按照 SOD 试剂盒（购自南京建成生物工程研究所）说明书进行。以每毫克蛋白在 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个活力单位（U）。

1.4.3 过氧化氢酶（CAT）活力测定：具体操作步骤按照 CAT 试剂盒（购自南京建成生物工程研究所）说明书进行。以每毫克蛋白每秒分解 1 μmol H_2O_2 的量为一个活力单位（U）。

1.4.4 过氧化物酶（POD）活力测定：具体操作步骤按照 POD 试剂盒（购自南京建成生物工程研究所）说明书进行。在 37℃条件下，每 mg 蛋白每 min 催化产生 1 μg 的底物的酶量定义为一个酶活力单位。

1.5 蛋白酶酶活力测定

1.5.1 中肠酶液制备：粘虫幼虫在 0～4℃下迅速解剖，用预冷的 0.15 mol/L NaCl 溶液冲洗，截取中肠及其内含物，不同处理时间各取样 4～6 头幼虫，加 1 mL 0.15 mol/L NaCl 溶液在冰浴中匀浆。15 000 × g 4℃离心 15 min，取上清液作为酶液。每处理重复 3 次。

1.5.2 中肠总蛋白酶活性测定：参照王琛柱和钦俊德（1996）方法，用氨苯磺胺偶氮酪蛋白作为底物。取 50 μL 20 mg/mL 偶氮酪蛋白溶液（用 0.15 mol/L NaCl 溶液配制），加入 30 μL 0.2 mol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液（pH 10.5）和 20 μL 酶液的反应液中，30℃反应 2 h 后，加入 100 μL 20 %（w/v）三氯乙酸终止反应。反应混合物在 4℃下 15 000 × g 离心 15 min，取上清液，用酶标仪在 366 nm 处测定吸光值。

1.5.3 类胰蛋白酶活力测定：以 BAPNA 和 TAME 为底物，分别测定强碱性类胰蛋白酶活性和弱碱性类胰蛋白酶活性。测定强碱性类胰蛋白酶活性时，取 40 μL 20 mg/mL BAPNA（溶于二甲基亚砜），加入 1.45 mL 0.1 mol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液（pH 10.5）和 50 μL 酶液的反应液中，30℃反应 20 min；用 0.5 mL 30%（v/v）乙酸终止反应后，在 406 nm 处测吸光值。测定弱碱性类胰蛋白酶活性时，取 40 μL 2 mmol/L TAME（溶于 0.15 mol/L NaCl 溶液），加入 1.45 mL 0.2 mol/L Tris-HCl 缓冲液（pH 8.5）和 50 μL 酶液的反应液中，30℃反应 20 min；用 0.5 mL 30 %（v/v）乙酸终止反应后，在 248 nm 测定吸光值。

1.5.4 类胰凝乳蛋白酶活力测定：以 BTEE 为底物。取 0.5 mL 1 mmol/L BTEE（溶于含有 10% 甲醇的 0.15 mol/L NaCl 溶液中），加入 450 μL 0.2 mol/L Tris-HCl 缓冲液（pH 8.5）和 50 μL 酶液的反应液中，30℃反应 15 min，在 256 nm 处测定光吸收值。

TAME，BAPNA 和 BTEE 的克分子消光值分别为 540，8 800 和 964，用以计算相应水解底物的摩尔数。

1.6 酶源蛋白质含量测定

采用考马斯亮蓝 G-250 法测定各处理酶源的可溶性蛋白含量（Bradford，1976），以牛血清蛋白（BSA）为标准蛋白。

1.7 数据统计与分析

数据应用统计软件 SPSS 11.0 进行分析。不同处理时间的酶活力差异比较采用 Tukey 氏检验；同一时间下，不同处理的酶活力差异比较采用 *t*-测验。

2 结果与分析

2.1 Cry1Ac 杀虫蛋白对粘虫幼虫体内解毒酶活力的影响

取食含 Cry1Ac 饲料 6，12，24 和 36 h 的幼虫，体内酯酶活力均显著低于取食正常饲料相同时间的个体（$P < 0.05$）（图 1∶A）；随着取食 Cry1Ac 时间的延长，酯酶活力逐渐降低，且差异显著（$P < 0.05$）。

取食含 Cry1Ac 饲料 6，12，24 和 36 h 的幼虫，体内谷胱甘肽-S-转移酶活力均显著低于取食正常饲料相同时间的个体（$P < 0.05$）（图 1∶B）；取食含 Cry1Ac 饲料 24 和 36 h 的幼虫，谷胱甘肽-S-转移酶活力显著低于取食 6 和 12 h 的个体（$P < 0.05$）。

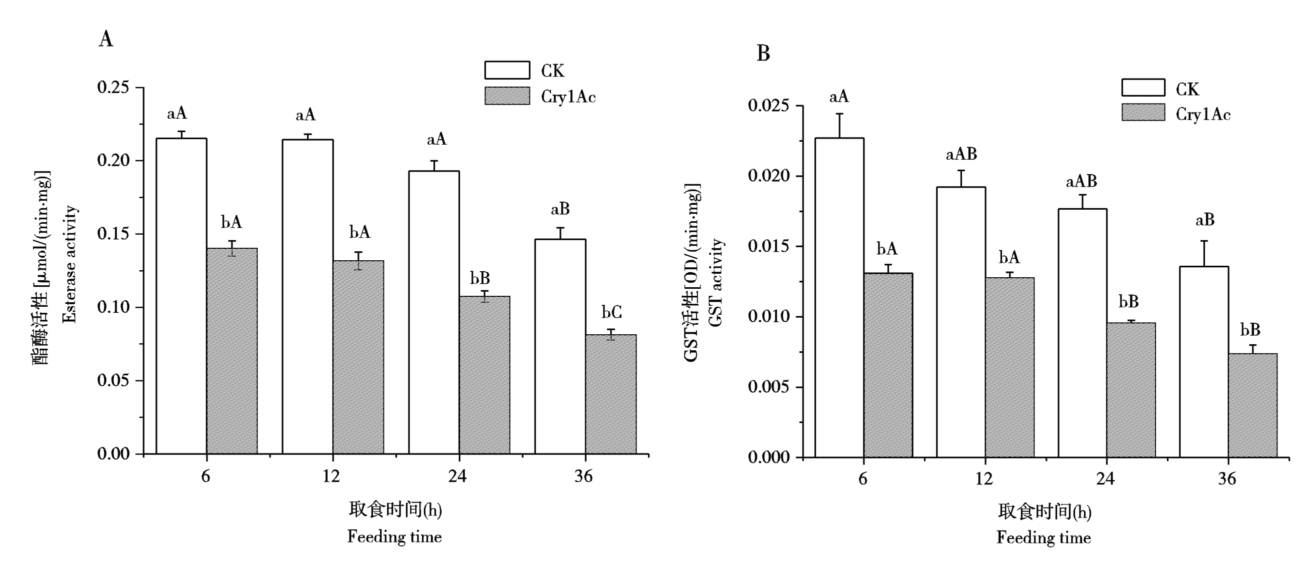


图 1　取食正常饲料和含 Cry1Ac 饲料后的粘虫 5 龄幼虫体内酯酶（A）和谷胱甘肽-S-转移酶（GST）（B）的活力变化

Fig. 1　Changes in activities of esterase (A) and glutathione-S-transferase (GST) (B) in 5th instar larvae of *Mythimna separata* fed on Cry1Ac toxin for different time

图中数据为平均数 ± 标准误；不同小写字母表示饲料类型之间差异显著（$P<0.05$），不同大写字母表示取食时间之间差异显著（$P<0.05$）；CK 即不含 Cry1Ac 的人工饲料；下图同。Data in the figure are mean ± *SE*. Different lowercase letters above bars indicate significant differences between artificial diet with Cry1Ac toxin and artificial diet without Cry1Ac toxin ($P<0.05$), while different capital letters indicate significant differences among different feeding time ($P<0.05$). CK represents artificial diet without Cry1Ac toxin. The same for the following figures.

2.2　Cry1Ac 杀虫蛋白对粘虫幼虫体内保护酶活力的影响

取食含 Cry1Ac 饲料 6，12，24 和 36 h 的幼虫，体内超氧化物歧化酶活力均显著高于取食正常饲料相同时间的个体（$P<0.05$）（图 2：A）；随着取食 Cry1Ac 时间的延长，超氧化物歧化酶活力呈现先降低后升高的趋势。

取食含 Cry1Ac 饲料 6，12 和 24 h 的幼虫，体内过氧化氢酶活力均显著低于取食正常饲料相同时间的个体（$P<0.05$）（图 2：B），取食含 Cry1Ac 饲料 36 h 的幼虫，体内过氧化氢酶活力显著高于取食正常饲料相同时间的个体（$P<0.05$）；随着取食 Cry1Ac 时间的延长，过氧化氢酶活力逐渐升高，且差异显著（$P<0.05$）。

取食含 Cry1Ac 饲料 6，12，24 和 36 h 的幼虫，体内过氧化物酶活力均显著低于取食正常饲料相同时间的个体（$P<0.05$）（图 2：C）；随着取食 Cry1Ac 时间的延长，过氧化物酶活力呈现先升高后降低的趋势。

2.3　Cry1Ac 杀虫蛋白对粘虫幼虫体内蛋白酶活力的影响

取食含 Cry1Ac 饲料 12 和 24 h 的幼虫，体内总蛋白酶活力均显著高于取食正常饲料相同时间的个体（$P<0.05$）（图 3：A），36 h 时则显著低于取食正常饲料相同时间的个体（$P<0.05$）；随着取食 Cry1Ac 时间的延长，总蛋白酶活力呈现先升高后降低的趋势。

取食含 Cry1Ac 饲料 6，12 和 24 h 的幼虫，体内强碱性类胰蛋白酶活力均显著低于取食正常饲料相同时间的个体（$P<0.05$）（图 3：B）；取食含 Cry1Ac 饲料 24 和 36 h 的幼虫，强碱性类胰蛋白酶活力显著高于 6 和 12 h 的个体（$P<0.05$）。

取食含 Cry1Ac 饲料 6，12 和 24 h 的幼虫，体内弱碱性类胰蛋白酶活力均显著低于取食正常饲料相同时间的个体（$P<0.05$）（图 3：C）；随着取食 Cry1Ac 时间的延长，弱碱性类胰蛋白酶活力呈现先升高后降低的趋势。

取食含 Cry1Ac 饲料 6，12 和 24 h 的幼虫，体内类胰凝乳蛋白酶活力均显著低于取食正常饲料相同时间的个体（$P<0.05$）（图 3：D）；取食含 Cry1Ac 饲料 24 和 36 h 的幼虫，类胰凝乳蛋白酶活力显著高于 6 和 12 h 的个体（$P<0.05$）。

3　讨论

昆虫解毒酶对分解外源毒物、维持正常生理代谢起重要作用。丁双阳等（2001）研究证实转 Bt 基因杨树叶片对美国白蛾幼虫中肠酯酶有明显抑制作

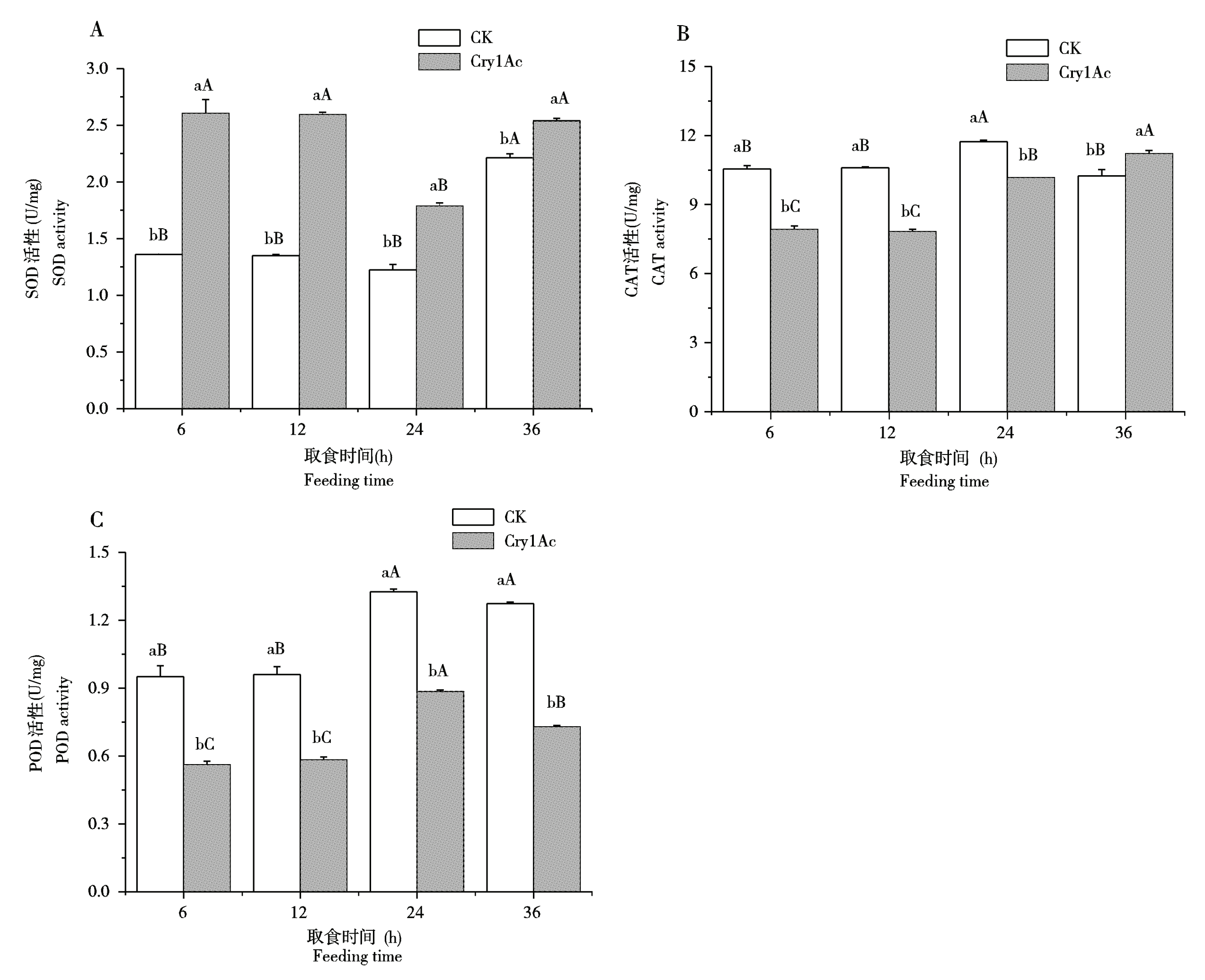


图 2 取食正常饲料和含 Cry1Ac 饲料后的粘虫 5 龄幼虫体内超氧化物歧化酶(SOD)(A)、过氧化氢酶(CAT)(B)和过氧化物酶(POD)(C)的活力变化

Fig. 2 Changes in activities of superoxide dismutase (SOD)(A), catalase (CAT)(B) and peroxidase (POD)(C) in 5th instar larvae of *Mythimna separata* fed on Cry1Ac toxin for different time

用，而且随饲喂时间的延长抑制作用加强，谷胱甘肽-S-转移酶变化比较复杂。本研究结果表明，取食含 Cry1Ac 饲料 6,12,24 和 36 h 的幼虫，体内酯酶和谷胱甘肽-S-转移酶活力均明显受到抑制，显著低于对照，且随着取食时间的延长，活力逐渐降低。这与丁双阳等(2001)的报道基本相同。

超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)是生物体内普遍存在的防御氧化损伤的重要保护酶，这几种保护酶处于一种动态平衡状态，使自由基维持在一个低水平，起到保护生物机体的作用(李周直等，1994)。Ding 等(2001)报道转 Bt 基因欧洲黑杨 *Populus nigra* L. 可使美国白蛾 *Hyphantria cunea* 幼虫中肠内的 SOD，CAT 和 POD 活性逐渐升高，达到峰值后突然降低。郭同斌等(2006)研究表明，杨小舟蛾幼虫取食转 Bt 单基因和转 Bt + CpTI 双价基因杨树叶片后，其中肠 SOD 活性显著上升，而 CAT 和 POD 活力受到了显著抑制。本实验结果表明，取食含 Cry1Ac 饲料 6，12，24 和 36 h 的幼虫，体内 SOD 活力均显著高于对照；CAT 活力在 6,12 和 24 h 显著低于对照，36 h 时则显著高于对照；POD 活力均显著低于对照，这与 Ding 等(2001)的研究结果有所不同，与郭同斌等(2006)的研究结果基本一致。粘虫取食含Cry1Ac饲料后，对毒蛋白作出类似于抗性的反应，导致其中肠 SOD 活力显著上升，机体内产生了大量的 H_2O_2，而此时 CAT 和 POD 活力又受到了显著抑制，造成体内清除自由基遇到了障碍。因此，Cry1Ac 杀虫蛋白在被害虫摄入后，可能扰乱了幼虫中肠 SOD，CAT 和 POD 3 种保护酶的动态平衡，对虫体产生伤害作用。

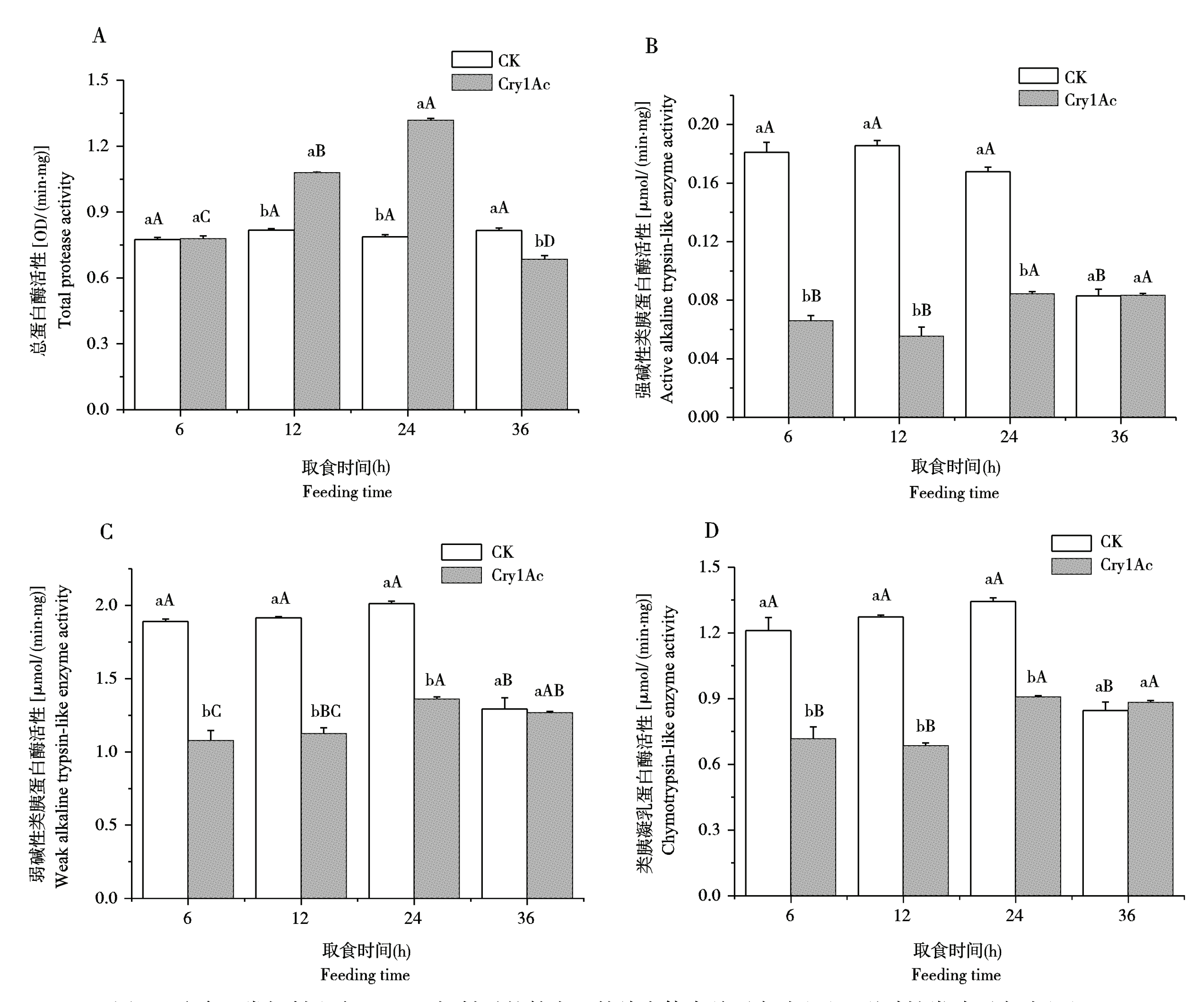


图 3　取食正常饲料和含 Cry1Ac 饲料后的粘虫 5 龄幼虫体内总蛋白酶(A)、强碱性类胰蛋白酶(B)、弱碱性类胰蛋白酶(C)和类胰凝乳蛋白酶(D)的活力变化

Fig. 3　Changes in activities of total protease (A), active alkaline trypsin-like enzyme (B), weak alkaline trypsin-like enzyme (C) and chymotrypsin-like enzyme (D) in 5th instar larvae of *Mythimna separata* fed on Cry1Ac toxin for different time

昆虫中肠蛋白酶是中肠上皮细胞分泌的消化蛋白质和碳水化合物的重要酶。本研究结果表明，取食含 Cry1Ac 饲料 6,12 和 24 h 的幼虫，体内强碱性类胰蛋白酶、弱碱性类胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶活力均显著低于对照。总蛋白酶活力在 12 和 24 h 显著高于对照，36 h 时显著低于对照。徐艳聆等(2006)结果表明：取食表达 Cry1Ab 杀虫蛋白的转 Bt 基因玉米后，亚洲玉米螟幼虫的强碱性类胰蛋白酶活性明显高于对照，且随时间延长呈升高趋势。梁革梅等(2001)在对 Bt 抗感种群间蛋白酶活性的比较中，也发现抗性种群棉铃虫幼虫的强碱性类胰蛋白酶活力显著高于敏感种群。本研究结果与之不同，其原因可能是不同种类害虫对不同杀虫蛋白具有不同的应激反应，其具体原因有待进一步研究。Bt 杀虫蛋白被幼虫消化后，引起肠道细胞破坏、pH 值发生变化、中肠蛋白酶活性下降，对虫体产生伤害。

综上所述，Cry1Ac 杀虫蛋白可能是通过抑制粘虫幼虫中肠解毒酶和蛋白酶的活性，扰乱 SOD，CAT 和 POD 3 种保护酶的动态平衡而干扰昆虫正常的生理代谢，从而起到毒杀害虫的作用。

参考文献 (References)

Blumberg D, Navon A, Keren S, Goldenberg S, Ferkovich SM, 1997. Interactions among *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), its larval endoparasitoid *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae), and *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol*., 90 (5): 1181－1186.

Booth J, Boyland E, Sims P, 1961. An enzyme from rat liver catalyzing

conjugation with glutathione. *Biochem. J.*, 79: 516 – 524.

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248 – 254.

Chang X, Chang XY, He KL, Wang ZY, Bai SX, 2007. Resistance evaluation of transgenic Bt maize to Oriental armyworm. *Acta Phytophylacica Sinica*, 34(3): 225 – 228. [常雪, 常雪艳, 何康来, 王振营, 白树雄, 2007. 转 Cry1Ab 基因玉米对粘虫的抗性评价. 植物保护学报, 34(3): 225 – 228]

Ding SY, Li HY, Li XF, Zhang ZY, 2001. Effects of Bt transgenic poplar on detoxification enzymes and AChE in American white moth larvae. *Journal of Northeast Forestry University*, 29(3): 28 – 30. [丁双阳, 李怀业, 李学锋, 张志毅, 2001. 转 Bt 基因杨树对美国白蛾幼虫中肠解毒酶及乙酰胆碱酯酶的影响. 东北林业大学学报, 29(3): 28 – 30]

Ding SY, Li HY, Li XF, Zhang ZY, 2001. Effects of two kinds of transgenic poplar on protective enzymes system in the midgut of larvae of American white moth. *Journal of Forestry Research*, 12(2): 119 – 122.

Gao JH, Zhang YE, Zhao QC, Lin CY, Xu XL, Shen ZC, 2011. Transgenic rice expressing a fusion protein of Cry1Ab and Cry9Aa confers resistance to a broad spectrum of lepidopteran pests. *Crop Science*, 51: 2535 – 2543.

Guo TB, Ji BZ, Jiang JH, Du W, ZhuGe Q, Huang MR, 2006. Effect of transgenic poplars on the activities of three protective enzymes in *Micromelalopha troglodyte* (Graeser) (Lepidoptera: Notodontidae). *Acta Entomologica Sinica*, 49(3): 381 – 386. [郭同斌, 嵇保中, 蒋继宏, 杜伟, 诸葛强, 黄敏仁, 2006. 转基因杨树对杨小舟蛾体内三种保护酶活力的影响. 昆虫学报, 49(3): 381 – 386]

He KL, Wang ZY, Zhou DR, Wen LP, Song YY, Yao ZY, 2003. Evaluation of transgenic Bt corn for resistance to the Asian corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.*, 96(3): 935 – 940.

Jiang SJ, 2011. Evaluation on the Ecological Safety of Cry1Ab and Cry1Ac Toxin to the Oriental Armyworm, *Mythimna separata* and Its Parasitoids. MSc Thesis, Huazhong Agricultural University, Wuhan. [蒋善军, 2011. Cry1Ab 和 Cry1Ac 杀虫蛋白对粘虫及其寄生天敌的生态安全性评价. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文]

Jiang SJ, Luo LZ, Hu Y, Zhang L, 2010. Effects of Cry1Ac protein on growth and development, reproduction and flight potential of the oriental armyworm, *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 53(12): 1360 – 1366. [蒋善军, 罗礼智, 胡毅, 张蕾, 2010. Cry1Ac 毒蛋白对粘虫生长发育、繁殖及飞行能力的影响. 昆虫学报, 53(12): 1360 – 1366]

Li GB, 1979. Integrated pest management of the oriental armyworm. In: Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences ed. The Integrated Pest Management in China. Science Press, Beijing. 301 – 319. [李光博, 1979. 粘虫的综合防治. 见: 中国科学院动物研究所 主编. 中国主要害虫防治. 北京: 科学出版社. 301 – 319]

Li GB, Wang HX, Hu WX, 1964. Route of the seasonal migration of the oriental armyworm moth in the eastern part of China as indicated by a three-year result of releasing and recapturing of marked moths. *Acta Phytophylacica Sinica*, 3(2): 101 – 110. [李光博, 王恒祥, 胡文绣, 1964. 粘虫季节性迁飞为害假说及标记回收试验. 植物保护学报, 3(2): 101 – 110]

Li ZZ, Shen HJ, Jiang QG, Ji BZ, 1994. A study on the activities of endogenous enzymes of protective system in some insects. *Acta Entomologica Sinica*, 37(4): 399 – 403. [李周直, 沈惠娟, 蒋巧根, 嵇保中, 1994. 几种昆虫体内保护酶系统活力的研究. 昆虫学报, 37(4): 399 – 403]

Liang GM, Tan WJ, Guo YY, 2001. Comparison of some detoxification enzyme and midgut protease activities between resistant and susceptible cotton bollworm population to Bt. *Acta Phytophylacica Sinica*, 28(2): 133 – 138. [梁革梅, 谭维嘉, 郭予元, 2001. 棉铃虫 Bt 抗感种群间数种解毒酶和中肠蛋白酶活性的比较. 植物保护学报, 28(2): 133 – 138]

Liu YB, Tabashnik BE, Dennehy TJ, Patin AL, Sims MA, Meyer SK, Carrière Y, 2001. Effects of Bt cotton and Cry1Ac toxin on survival and development of pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae). *J. Econ. Entomol.*, 94(5): 1237 – 1242.

Olsen KM, Daly JC, 2000. Plant-toxin interactions in transgenic Bt cotton and their effect on mortality of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 93(4): 1293 – 1299.

Stewart SD, Adamczyk JJ, Knighten KS, Davis FM, 2001. Impact of Bt cottons expressing one or two insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* Berliner on growth and survival of noctuid (Lepidoptera) larvae. *J. Econ. Entomol.*, 94(3): 752 – 760.

Sun ZX, 2008. Studies on the Resistance Screening and Mechanisms of Transgenic Cry1Ac Plus CpTI Cotton to *Helicoverpa armigera* (Hübner). MSc Thesis, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing. [孙志新, 2008. 棉铃虫对双价(Bt + CpTI)抗虫棉抗性筛选及抗性机理的初步研究. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文]

van Asperen K, 1962. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *J. Insect Physiol.*, 8: 401 – 406.

Wang CZ, Qin JD, 1996. Partial characterization of protease activity in the midgut of *Helicoverpa armigera* larvae. *Acta Entomologica Sinica*, 39(1): 7 – 13. [王琛柱, 钦俊德, 1996. 棉铃虫幼虫中肠主要蛋白酶活性的鉴定. 昆虫学报, 39(1): 7 – 13]

Wang DY, Wang ZY, He KL, Cong B, Wen LP, Bai SX, 2004. Food consumption and utilization of the fifth instar larvae of *Mythimna separata* (Walker) feeding on the leaves of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn expressing Cry1Ab protein. *Acta Entomologica Sinica*, 47(2): 141 – 145. [王冬妍, 王振营, 何康来, 丛斌, 文丽萍, 白树雄, 2004. 粘虫高龄幼虫对转 Bt 基因玉米的消化和利用. 昆虫学报, 47(2): 141 – 145]

Wang ZY, Wang DY, He KL, Bai SX, Cong B, 2005. Evaluation the control effects of the transgenic *Bacillus thuringiensis* corn expressing Cry1Ab protein on the larvae of *Mythimna separata* (Walker) in laboratory. *Acta Phytophylacica Sinica*, 32(2): 153 – 157. [王振营, 王冬妍, 何康来, 白树雄, 丛斌, 2005. 转 Bt 基因玉米对粘虫的室内杀虫效果评价. 植物保护学报, 32(2): 153 – 157]

Wu G, Harris MK, Guo JY, Wan FH, 2008. Response of multiple generations of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner),

feeding on transgenic Bt cotton. *J. Appl. Entomol.*, 133: 90 – 100.

Wu KM, Guo YY, Lv N, Greenplate JT, Deaton R, 2003. Efficacy of transgenic cotton containing a *cry1Ac* gene from *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in northern China. *J. Econ. Entomol.*, 96(4): 1322 – 1328.

Xu YL, Wang ZY, He KL, Bai SX, 2006. Effects of transgenic Bt corn expressing Cry1Ab toxin on activities of some enzymes in larvae of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenée) (Lepidoptera: Pyralidae). *Acta Entomologica Sinica*, 49(4): 562 – 567. [徐艳聆，王振营，何康来，白树雄，2006. 转 Bt 基因抗虫玉米对亚洲玉米螟幼虫几种主要酶系活性的影响. 昆虫学报，49(4): 562 – 567]

Yun GL, Deng SD, Zhang QW, Xu HL, Cai QN, 2004. The resistance of Bt corn (MG95) to *Pseudaletia separata*. *Entomological Knowledge*, 41(5): 422 – 426. [贠桂玲，邓曙东，张青文，徐环李，蔡青年，2004. Bt 玉米(MG95)对粘虫的抗性和拒食作用. 昆虫知识，41(5): 422 – 426]

Zhang SY, Li DM, Cui J, Xie BY, 2006. Effects of Bt-toxin Cry1Ac on *Propylaea japonica* Thunberg (Col., Coccinellidae) by feeding on Bt-treated Bt-resistant *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lep., Noctuidae) larvae. *J. Appl. Entomol.*, 130(4): 206 – 212.

(责任编辑：赵利辉)